

PCT/EP2004/052788

Mod. C.E. - 1-4-7

19 NOV 2004

EP04/52788

# Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2

REC'D 18 NOV 2004

WIPO PCT

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:  
Invenzione Industriale N. MI2003A002185 del 12/11/2003

Si dichiara che l'unità copia è conforme ai documenti originali depositati con la domanda di brevetto sopra specificata, i cui dati risultano dall'accusato processo verbale di deposito.

19 NOV 2004

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

IL FUNZIONARIO

*Elena Marinelli*

Sig.ra E. MARINELLI

BEST AVAILABLE COPY



## RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE, DESCRIZIONI E RIVENDICAZIONE

NUMERO DOMANDA 2003A002185

REG. A

DATA DI DEPOSITO 12/NOV/2003

NUMERO BREVETTO

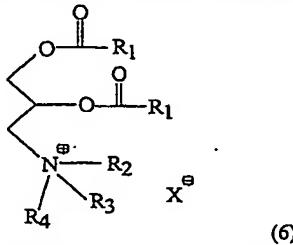
DATA DI RILASCIO 12/12/2003

## D. TITOLO

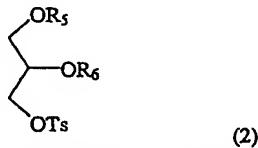
Processo per la sintesi di lipidi cationici

## L. RIASSUNTO

Un processo per la sintesi di cationi lipidici aventi formula generale (6):

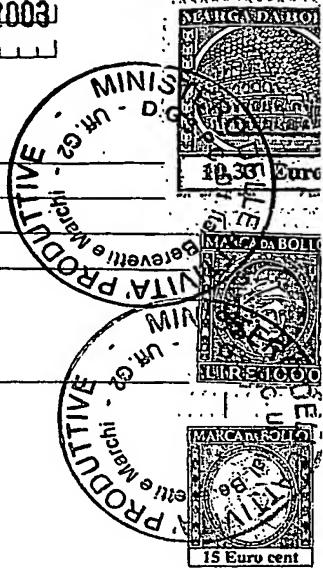


dove:  $\text{R}_1$  rappresenta una catena lipofilica;  $\text{R}_2$ ,  $\text{R}_3$ ,  $\text{R}_4$  uguali o diversi tra loro rappresentano radicali alchilici  $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ , alchenilici  $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ , alchinilici  $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ , optionalmente contenenti funzioni idrossiliche, etere, alogenici e acilossi;  $\text{X}^{\ominus}$  è un ossianione o un alogenuro; in cui un composto di formula (2),



dove  $\text{R}_5$  e  $\text{R}_6$  uguali o diversi tra loro rappresentano un acile  $\text{C}_1\text{-C}_3$ , un gruppo benzile o un gruppo protettivo dei dioli, è fatto reagire in un solvente alcolico con da 1 a 6 equivalenti di  $\text{NR}_2\text{R}_3\text{R}_4$ .

## M. DISEGNO



Bp

DESCRIZIONE dell'invenzione industriale a nome CHEMI S.p.A. con sede in Cinisello Balsamo (MI)

\*\*\*\*\*

La presente invenzione ha per oggetto una sintesi, economica sicura ed attuabile su larga scala, di cationi lipidici aventi la formula generale riportata in figura 1:

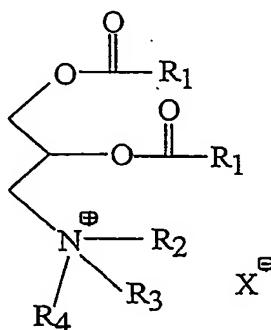


Figura 1

MI 2003 002185

dove:

$\text{R}_1$  rappresenta una catena lipofilica preferibilmente selezionata tra radicali alchilici  $\text{C}_1\text{-C}_{24}$ , alchenilici  $\text{C}_1\text{-C}_{24}$ , alchinili  $\text{C}_1\text{-C}_{24}$ , alcanoilici  $\text{C}_1\text{-C}_{24}$ , alchenoilici o alchinoilici  $\text{C}_1\text{-C}_{24}$ ;

$\text{R}_2$ ,  $\text{R}_3$ ,  $\text{R}_4$  uguali o diversi tra loro rappresentano radicali alchilici  $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ , alchenilici  $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ , alchinili  $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ , optionalmente contenenti funzioni idrossiliche, etere, alogeni e acilossi;

$\text{X}^-$  è un ossianione o un alogenuro.

In particolare essa ha per oggetto la sintesi dell' $\text{N}\text{---}[1\text{---}(2,3\text{-dioleilossi})\text{propil}]\text{---N,N,N-trimetilammonio cloruro}$  (DOTAP-Cl) la cui struttura è riportata in figura 2:

RM

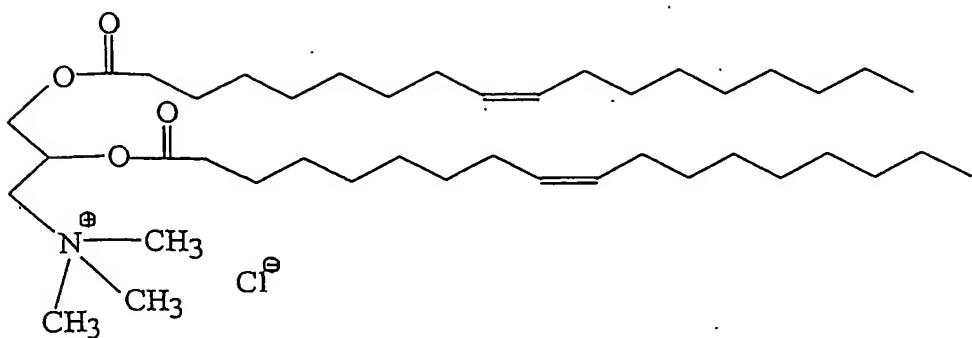


Figura 2

Il DOTAP-Cl è un composto che appartiene alla classe della citofectine. Queste molecole cationiche anfifiliche trovano applicazione nel campo della terapia genica e in particolare in quello della transfezione (processo attraverso il quale frammenti di DNA o RNA esogeno vengono trasportati attraverso le membrane cellulari di cellule ospiti).

Varie strategie sono state adottate per realizzare questo scopo, alcune delle quali basate su l'utilizzo di virus ricombinanti come vettori. Le tecniche suddette possono tuttavia incontrare diversi problemi, come ad esempio quelli di natura immunologica, dovuti alla presenza di anticorpi negli organismi ospiti; oppure quelli di natura epidemiologica, correlati con la pur remota possibilità di creare così un nuovo virus mutante in grado di diventare potenzialmente infettivo e quindi pericoloso.

Per cercare di evitare questi rischi sono state sviluppate delle tecniche alternative basate appunto sulla formulazione di complessi liposomiali, a base di cationi lipidici contenenti acidi nucleici o più in generale molecole farmacologicamente attive, in grado di "fondersi" con le membrane cellulari rilasciando il loro contenuto nel citoplasma (da questo il nome citofectine).

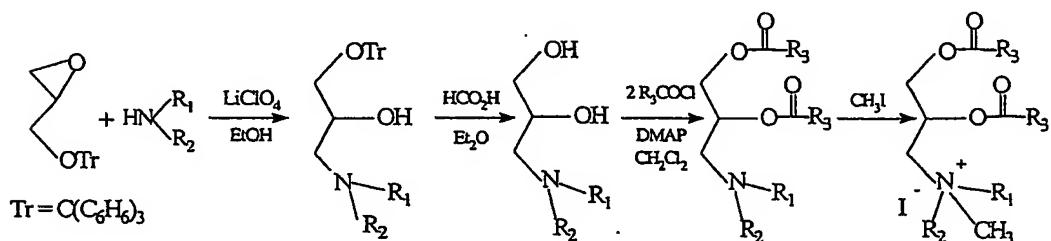
Anche se ancora oggi il meccanismo del loro funzionamento su base

*Prop*

molecolare rimane nel dettaglio sconosciuto, questi complessi si sono dimostrati efficaci nel trasporto e nel rilascio intracellulare di materiale genico e di principi attivi.

#### CAMPO DELL'INVENZIONE

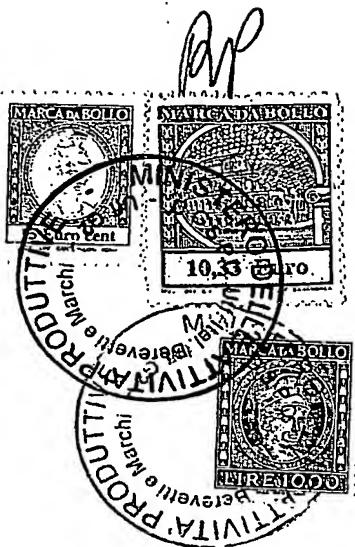
Il DOTAP, ovvero l'N-[1-(2,3-dioleilossi)propil]-N,N,N-trimetilammonio, è uno dei lipidi cationici più utilizzati nelle formulazioni liposomiali contenenti acidi nucleici, per questo motivo sono riportati in letteratura vari approcci alla sintesi di questa molecola; ad esempio nel brevetto statunitense US5925623 (M.H. Nantz; M.J.Bennet et al.) è descritto il metodo di sintesi qui sotto riportato nello Schema 1:



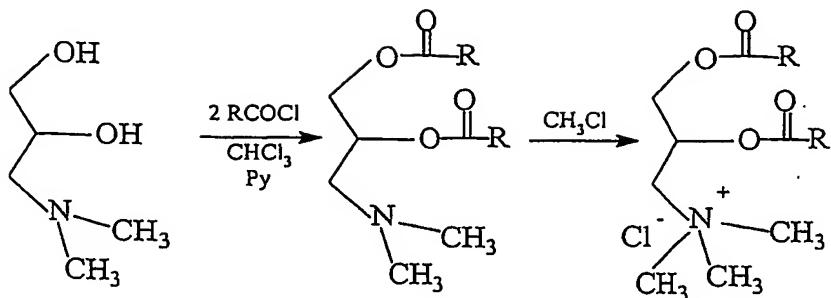
SCHEMA 1

Tale sintesi rappresenta un approccio molto flessibile per la preparazione di tutta una famiglia di lipidi cationici; per l'ottenimento della quaternarizzazione dell'atomo di azoto essa tuttavia prevede l'uso di agenti metilanti molto tossici e potenzialmente cancerogeni (quali ad esempio lo iodometano) e quindi difficilmente utilizzabili in preparazioni su larga scala.

Nell'esempio 5 del brevetto statunitense US5264618 (P.L. Feliner; R. Kumar; C. Basava et al.) è descritto il metodo di sintesi qui sotto riportato



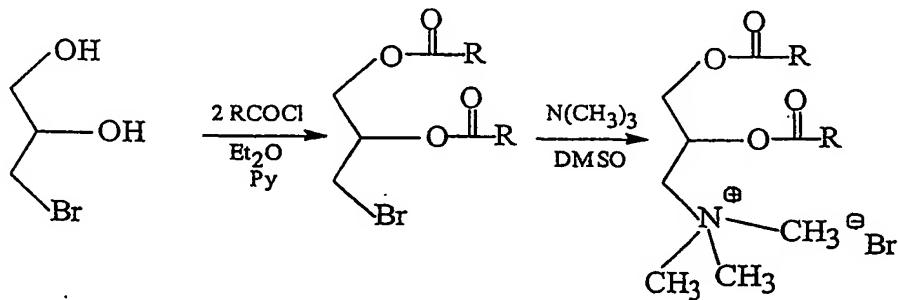
nello Schema 2:



SCHEMA 2

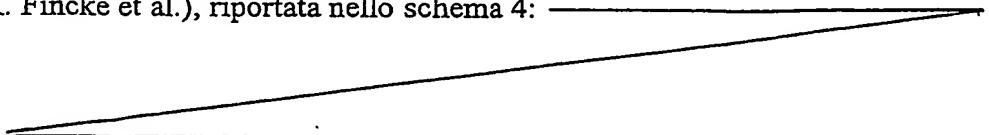
Anche in questa sintesi sono tuttavia utilizzati reattivi metilanti tossici (in questo caso clorometano), incontrando così problemi analoghi a quelli della precedente preparazione, quando realizzata su larga scala.

Altre sintesi del DOTAP descritte in letteratura sono quelle proposte da L. Stratamatatos, et al. *Biochemistry* 27:3917-3925 (1988) riportata nello schema 3:

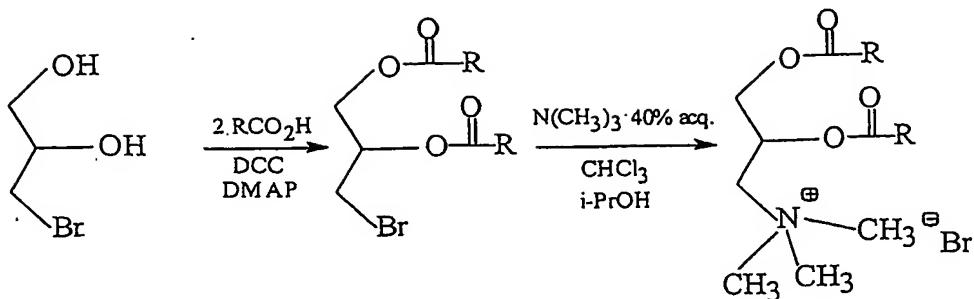


SCHEMA 3

e quella che prevede gli stessi intermedi, ma impiega diversi reattivi, descritta nella domanda di brevetto tedesco DE4013632A1 (H. Weickmann; K. Fincke et al.), riportata nello schema 4:



MP



SCHEMA 4

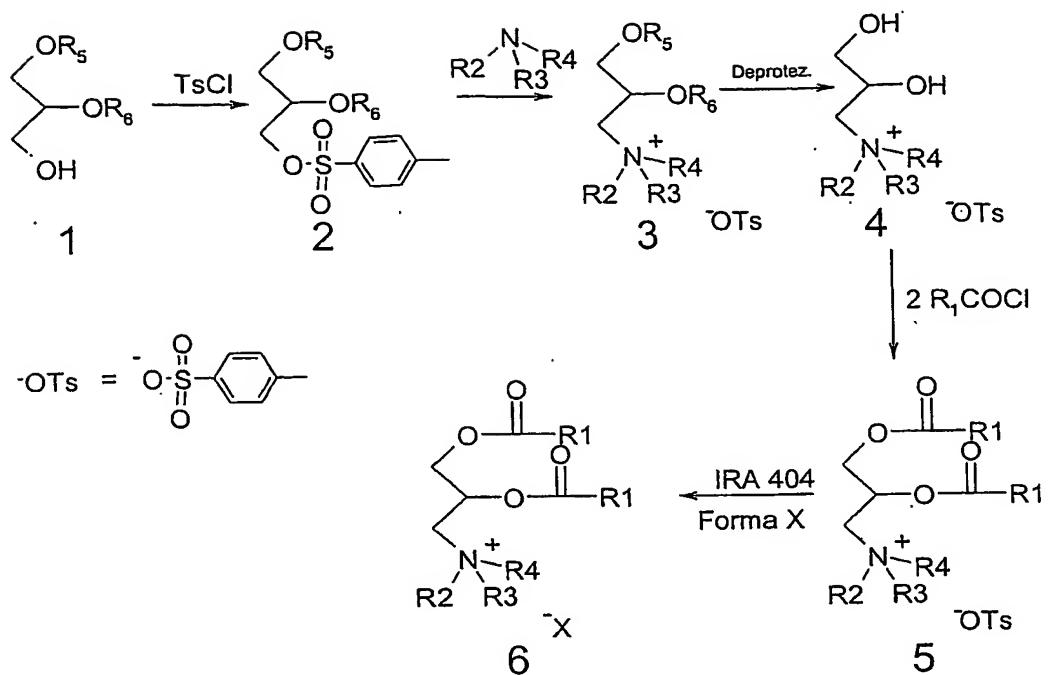
Queste sintesi pur non prevedendo l'uso di reattivi tossici e pericolosi non risultano convenienti per la realizzazione di preparazioni industriali in quanto partono da una materia prima (bromopropandiolo) relativamente costosa; la purificazione del prodotto finale viene inoltre effettuata mediante una tecnica complessa e costosa, quale la cromatografia su gel di silice, peraltro prevista anche nelle sintesi precedentemente indicate negli schemi 1 e 2.

Quindi alla luce dei documenti di letteratura si evince che non è presente un processo di sintesi del DOTAP in grado di poter essere effettuato in modo semplice su larga scala.

#### DESCRIZIONE DELL'INVENZIONE

La presente invenzione ha per oggetto un processo per la sintesi su larga scala del DOTAP-Cl (e più in generale dei lipidi cationici di struttura affine riportati in figura 1) a partire da materie prime facilmente disponibili e a basso costo; tale processo è riassumibile attraverso lo schema 5, qui sotto riportato, dove  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  ed  $X^+$  hanno i significati precedentemente elencati e dove  $R_5$  e  $R_6$  uguali o diversi tra loro rappresentano un acile  $C_1-C_5$ , un gruppo benzile o un gruppo protettivo dei dioli.

App



SCHEMA 5

Uno degli aspetti più innovativi del presente processo è quello di essere riusciti a sintetizzare in modo semplice e senza l'ausilio di reagenti tossici e/o troppo costosi l'intermedio avente la formula generale indicata nella figura 3;

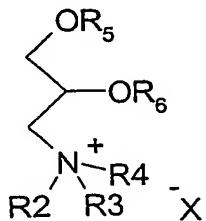


Figura 3

dove  $\text{R}_2$ ,  $\text{R}_3$ ,  $\text{R}_4$ ,  $\text{R}_5$ ,  $\text{R}_6$  ed  $\text{X}^-$  hanno il significato precedentemente riportato.

Con il termine "gruppo protettivo dei dioli" si intende uno dei gruppi

APP

protettivi normalmente utilizzati per la protezione degli 1,2- e 1,3-dioli; tali gruppi protettivi sono ben noti nell'arte e sono descritti ad esempio in Greene et al., *Protective Groups in Organic Synthesis*, Third Edition, John Wiley & Sons, 1999, qui incorporato per riferimento. Tra i vari gruppi protettivi descritti nel libro suddetto, quelli preferiti per l'attuazione della presente invenzione sono i chetali ciclici; più nel dettaglio, secondo la migliore realizzazione dell'invenzione,  $R_5$  e  $R_6$  insieme rappresentano isopropilidene; in tal caso, quando  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  sono radicali metilici, il composto assume la formula di struttura preferita riportata in figura 3bis.

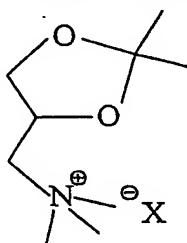


Figura 3bis

dove  $X^-$  ha il significato precedentemente riportato.

In letteratura sono riportati diverse metodiche per la preparazione di composti riconducibili a quelli di figura 3, come ad esempio quelli descritti nel brevetto statunitense US6084131 (R.I. Hollingsworth; G. Wang) oppure in D.J. Triggle; B. Belleau *Can. J. Chem.* 40: 1201-1215 (1962); queste sintesi prevedono tuttavia la quaternarizzazione della funzione amminica tramite agenti metilanti molto tossici e potenzialmente cancerogeni, e sono quindi difficilmente realizzabili su scala industriale. Vie di sintesi alternative, che non richiedono l'impegno di agenti metilanti, sono descritte da S.L. Morris-Natschke; K.L. Meyer *Journal Med. Chem.* 33 (6): 1812-1818 (1990) e da D.A. Jaeger; J. Mohebalian; P.L. Rose *Langmuir* 6: 547-



554 (1990); tali vie di sintesi sono tuttavia di scarso interesse industriale in quanto molto laboriose e caratterizzate da rese piuttosto modeste.

Al contrario, il processo della presente invenzione consente in modo sorprendentemente semplice ed economico la preparazione su larga scala e con rese elevate dell'intermedio di figura 3; il prodotto così ottenuto è inoltre sufficientemente puro da poter essere impiegato senza ulteriori purificazioni.

#### DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Il primo passaggio del processo secondo la presente invenzione consiste nella preparazione del derivato tosilato di formula (2); tale reazione viene preferibilmente effettuata facendo reagire da 0.9 ad 1.2 equivalenti di composto di formula (1) con 1 equivalente di tosil alogenuro in un solvente organico apolare, preferibilmente un idrocarburo, ancora più preferibilmente toluene; tale reazione viene normalmente condotta ad una temperatura di 15÷35° C, ancora più preferibilmente a 20÷25° C, utilizzando da 0.8 a 1.2 litri di solvente per equivalente di substrato 1. Il composto (2) così ottenuto viene portato a residuo secondo tecniche convenzionali, preferibilmente per distillazione a pressione ridotta.

Nel secondo passaggio, 1 equivalente dell'intermedio (2) è fatto reagire con da 1 a 6 equivalenti di  $NR_2R_3R_4$ , dove  $R_2$ ,  $R_3$  ed  $R_4$ , uguali o diversi fra loro, hanno i significati precedentemente riportati e, preferibilmente, sono tutti e tre radicali metilici. La reazione viene condotta in un solvente alcoolico, preferibilmente etanolo, isopropanolo o metanolo, operando ad una temperatura di 50÷100°C; detto solvente è preferibilmente impiegato in quantità di 0.5÷1.5 litri per equivalente di  $NR_2R_3R_4$ . Il composto (3) così

VWP

ottenuto viene portato a residuo secondo tecniche convenzionali, preferibilmente per distillazione a pressione ridotta.

Nel terzo passaggio, viene rimosso il gruppo protettivo dei dioli a dare l'intermedio (4) utilizzando le tecniche note in letteratura; nel caso in cui il gruppo protettivo sia un chetale, la rimozione avverrà preferibilmente per idrolisi acida.

Per l'ottenimento del composto (5) si sospende il composto 4 in un solvente organico apolare aprotico, preferibilmente in un solvente clorurato, quale ad esempio cloruro di metilene, cloroformio o tetrachloruro di etile; il solvente viene preferibilmente utilizzato in quantità di 3.5÷5.5 litri per equivalente di composto (4). Si aggiungono quindi dai 2 ai 4 equivalenti di  $R_1COCl$ , dove  $R_1$  ha il significato sopra riportato, e si fa reagire ad una temperatura di 35÷45°C. Il composto (5) così ottenuto viene portato a residuo secondo tecniche convenzionali, preferibilmente per distillazione a pressione ridotta.

L'ultimo passaggio è rappresentato dallo scambio ionico dell'anione tosilato del composto (5) con l'anione alogenuro del composto (6); tale scambio viene preferibilmente effettuato per cromatografia su resina a scambio ionico basica forte. La purificazione finale del prodotto viene infine realizzata attraverso una semplice sequenza di cristallizzazioni, rendendo il processo più facilmente realizzabile su scala industriale.

Secondo la miglior realizzazione dell'invenzione il solchetal tosilato (2) è ottenuto a partire dall'isopropildenglicerolo (circa 1.1 equivalenti) mediante condensazione con cloruro di tosile (circa 1.0 eq.) in toluene a circa 25°C per 2 ore in presenza di trietilammina (circa 1.0 equivalenti) usata come scavenger per l'acido cloridrico che si forma come sottoprodotto di

AP

reazione. Terminata la reazione ed effettuati 3 lavaggi con acqua per rimuovere il trietilammonio cloruro e il solchetale in eccesso, la fase organica si porta a residuo ottenendo il prodotto (2) in maniera praticamente quantitativa e pronto per essere impiegato nella successiva reazione senza ulteriori purificazioni.

In un autoclave si caricano quindi il solchetale tosilato (2) (circa 1.0 equivalenti), la trimetilammmina acquosa al 40% (da 3 a 5 equivalenti, preferibilmente circa 4 ed un pari volume di metanolo) e si lascia in agitazione ad una temperatura dai 65÷85°C, preferibilmente a circa 75°C per una durata dalle 8 alle 24 ore, meglio se circa 16 ore. Terminata la reazione si allontanano a pressione ridotta l'eccesso di trimetilammna (che viene catturata salificandola in una trappola ad acido cloridrico al 10%) e i solventi fino all'ottenimento di un solido cremoso giallino che ripreso con acqua viene decolorato con carbone adsorbente (10 % p/p). Dopo circa 1 ora in agitazione a temperatura ambiente si filtra il carbone attivo e la soluzione acquosa contenente il 2,2-dimetil-4-trimetilammoniometil-1,3-diossolano tosilato (3) è pronta per il passaggio successivo della sintesi.

L'idrolisi dell'acetonide presente come gruppo protettivo nel composto 3 si effettua in acqua acidificando, preferibilmente con acido p-toluenosolfonico, fino a pH da 1 a 3 meglio se pH=1.5 ad una temperatura dai 30°C ai 50°C, meglio se a 40 °C, per una durata dalle 2 alle 5 ore meglio se 3.5 ore. A reazione completata si riporta il pH a neutralità con NaOH 6M, si concentra la soluzione a residuo a pressione ridotta, si riprende con MIBK (5 volume/peso) e si anidrifica mediante distillazione azeotropica con apparato di Dean-Stark.. Terminato l'allontanamento dell'acqua, l'1-2,diidrossi-

MP

trimetilammoniopropano tosilato (4) viene ottenuto come solido ceroso giallino per semplice concentrazione a pressione ridotta pronto per il passaggio successivo della sintesi.

Per l'ottenimento del DOTAP tosilato (5) si sospende il composto (4) in cloruro di metilene utilizzando dagli 8 ai 15 volumi/peso, meglio se 13 volumi/peso, e si aggiungono dai 2 ai 4 equivalenti, meglio se 3, di dimetilamminopiridina (DMAP); si aggiunge quindi il cloruro di oleoile (in pari equivalenti rispetto al DMAP) mantenendo la temperatura a circa 30°C; finita l'aggiunta si scalda a 35÷45°C meglio se a 40°C per una durata da 2 a 5 ore meglio se 3.5 ore. La reazione viene quindi spenta con 17 volumi di metanolo prolungando l'agitazione per circa 30 min; poi si effettuano 2 estrazioni con acqua a circa pH=3 e l'ultima a circa pH=6 con salamoia; la fase organica si porta a residuo a pressione ridotta ottenendo così il DOTAP tosilato (5) grezzo.

Il passaggio successivo per ottenere il DOTAP-Cl è rappresentato dallo scambio ionico del contro anione realizzato eluendo il DOTAP-OTs sciolto in metanolo (circa 3 volumi/peso) in una colonna chromatografica contenente una resina a scambio ionico basica forte in forma cloruro (da 2 a 8 equivalenti di resina per mole di prodotto); nella realizzazione più preferita si usano 5 equivalenti/mole di resina amberlite IRA 404 forma Cl (Rohm & Haas).

La purificazione finale del prodotto viene infine realizzata secondo tecniche classiche e, in particolare per cristallizzazione, preferibilmente da acetonitrile.

Gli esempi che seguono servono per spiegare ancora più nel dettaglio la

RMP

realizzazione della presente invenzione ed hanno scopo puramente esemplificativo e non limitativo della stessa.

### ESEMPI

#### ESEMPIO 1 (Sintesi del (R,S) solchetale tosilato - 2)

In un pallone a 4 colli da 2 litri, munito di agitatore meccanico e refrigerante a ricadere, sotto leggero flusso di azoto si caricano 8.85 g (73 mmol) di dimetilamminopiridina (DMAP), 74 g (733 mmol) di trietilammina (TEA), 100 g (757 mmol) di (R,S) solchetale e 420 ml di toluene. Si avvia l'agitazione a  $T=20 / 25^{\circ}\text{C}$ . Ottenuta una soluzione omogenea, da un imbuto di carico si gocciola in circa 1h una soluzione preparata in precedenza dissolvendo in una beuta 142 g (745 mmol) di p-toluensolfonilcloruro in 340 ml di toluene. Si mantiene in agitazione alla medesima temperatura per 2 ore quindi si spegne la reazione aggiungendo in 10 min. 715 ml di acqua e prolungando l'agitazione per altri 15 minuti. Dopo aver trasferito la miscela di reazione in un imbuto separatore, si separano le fasi. Alla fase organica si aggiungono 650 ml di acqua e 14 ml di HCl 33% si dibatte, si lascia decantare e si separano le fasi. Alla Fase organica si aggiungono 700 ml di acqua si dibatte e si separano le fasi. Quindi si effettua un'ulteriore estrazione con una soluzione di 70 g di bicarbonato di sodio disciolti in 650 ml di acqua ed infine si estrae un'ultima volta la fase organica con 700 ml di acqua. La fase organica così ottenuta si concentra a pressione ridotta ottenendo 195 g (682 mmol) del composto 2 sotto forma di olio giallognolo (resa 90%).

Il prodotto 2 in TLC (gel di silice) migra con un  $R_f = 0.9$  quando eluito con  $\text{CHCl}_3 / \text{Acetone} = 85 / 15$  e sviluppato con ceriosolfato





ammoniomolibdato.

ESEMPIO 2 (Sintesi del (R,S) 2,2-dimetil-4-trimetilammoniometil-1,3-diossolano tosilato - 3)

In un'autoclave da 600 ml si caricano 91 g (0.318 mol) di (R,S) solchetale tosilato (2), 205 ml di metanolo e 205 ml di trimetilammina aquosa al 40 %, si serra l'autoclave si avvia l'agitazione meccanica e si scalda a  $T = 75^{\circ}\text{C}$ , raggiunta questa temperatura tramite manometro si misura una pressione interna pari a 1.2 bar. Si mantengono agitazione e temperatura per 16 ore, quindi si trasferisce il contenuto dell'autoclave in un pallone a 4 colli da 1 litro munito di agitatore meccanico e refrigerante di Liebig con pallone di raccolta da 500 ml. Si avvia la distillazione a pressione ridotta nella quale i vapori provenienti dal pallone di raccolta vengono fatti passare in una trappola ad acido cloridrico al 10% per abbattere la trimetilammina in eccesso.

Terminata la distillazione il residuo ottenuto si scioglie in 300 ml di aqua distillata e sotto agitazione si aggiungono 9 g di carbone decolorante, si lascia in agitazione per 1 ora a temperatura ambiente ed infine si filtra il carbone su pannello di dicalite. La soluzione così ottenuta è pronta per la successiva idrolisi, per l'ottenimento del prodotto 3 è sufficiente allontanare l'acqua a pressione ridotta ottenendo 105 g (0.304 mol) di un solido ceroso giallino (resa 96%).

Il prodotto 3 in TLC (gel di silice) migra con un  $R_f = 0.4$  quando eluito con  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{COOH} = 10/0.25/0.25$  e sviluppato con ceriosolfato ammoniomolibdato.

$^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  7.7-7.3 (dd, 4 H, Ph); 4.65 (m, 1H,  $\text{OCHCH}_2$ );

MP

4.2 (dd, 1H,  $H'CHN(CH_3)_3$ ); 3.65 (dd, 1H,  $HCH'N(CH_3)_3$ ); 3.43 (m, 2H,  $OCH_2CH$ ); 3.1 (s, 9H,  $N(CH_3)_3$ ) 2.36 (s, 3H,  $Ph-CH_3$ ); 1.45-1.40 (2s, 6H,  $CH_3CCH_3$ ).

ESEMPIO 3 (Sintesi del (R,S)1,2-diidrossi-trimetilammoniopropano Tosilato - 4)

105 g (0.304 mol) di (R,S)2,2-dimetil-4-trimetilammoniometil-1,3-diossolanio tosilato (3) si sciolgono in 600 ml di acqua distillata, la soluzione si carica in un pallone a 3 colli munito di agitatore magnetico e pHmetro immerso, avviata l'agitazione si aggiunge una soluzione di acido p-toluensofonico al 10% fino raggiungere pH=1.5, terminata l'aggiunta si scalda a T=40°C mantenendo questa temperatura per 3.5 ore. Passato questo tempo riportata la soluzione a temperatura ambiente si aggiunge una soluzione al 10% di NaOH fino a pH=6. La soluzione ottenuta si porta a residuo a pressione ridotta; infine si anidrifica riprendendo il residuo con 800 ml di metilisobutilchetone (MIBK) ed effettuando una distillazione azeotropica con un apparato di Dean-Stark. Ottenuti con una resa praticamente quantitativa 92 g (0.301 mol) di 1,2-diidrossi-trimetilammoniopropano Tosilato come solido ceroso giallognolo.

$^1H$  NMR (200 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  7.7-7.3 (dd, 4 H, Ph); 4.2 (m, 1H,  $OCHCH_2$ ); 3.55 (m, 2H,  $CH_2N(CH_3)_3$ ); 3.40 (m, 2H,  $OCH_2CH$ ); 3.1 (s, 9H,  $N(CH_3)_3$ ) 2.36 (s, 3H,  $Ph-CH_3$ ).

ESEMPIO 4 (Sintesi del (R,S)1,2-dioleoil-trimetilammoniopropano tosilato - 5)

In un pallone a 4 colli da 2 litri munito di agitatore meccanico, refrigerante a ricadere e sotto leggero flusso di azoto si caricano 92 g (0.301 mol) di 1,2-

MP

diidrossi-trimetilammoniopropano tosilato (4), 105 g (0.85 mol) di dimetilaminopiridina (DMAP) e 1.35 litri di  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , si avvia l'agitazione fino ad ottenere una soluzione omogenea, a questa si aggiungono goccia a goccia in circa 20 minuti controllando, con un bagno freddo, che la temperatura non superi i  $30^\circ\text{C}$ , 246 g (0.82 mol) di oleil cloruro. Terminata l'aggiunta si mantiene in agitazione per 3.5 ore. A reazione terminata, a temperatura ambiente si aggiungono 1.75 litri di  $\text{CH}_3\text{OH}$ , si mantiene in agitazione per 30 minuti; quindi si aggiungono 1.75 litri di acqua distillata e sotto agitazione si aggiunge  $\text{HCl}$  33% (25 g) fino a pH 3/3.5 della fase acquosa, si ferma l'agitazione e si trasferisce il tutto in un imbuto separatore da 5 litri. Si separano le fasi. Alla fase organica inferiore si aggiungono 870 ml di acqua distillata e 870 ml di  $\text{CH}_3\text{OH}$ , si dibatte vigorosamente, si lascia decantare e si separano le fasi. Alla fase organica inferiore si aggiungono 870 ml di acqua distillata e 870 ml di  $\text{CH}_3\text{OH}$  e sotto agitazione si aggiunge  $\text{NaOH}$  al 10% (1 g) fino a pH della fase acquosa pari a 6, sempre sotto agitazione si aggiungono 30 ml di  $\text{NaCl}$  soluzione satura, quindi si lascia decantare e si separano le fasi. La fase organica inferiore ricca si concentra fino a residuo, ottenuti 264 g: il titolo HPLC del DOTAP-OTs (5) contro standard esterno in questo grezzo era pari al 66% (174 g; 0.21 mol), resa 69%.

Il prodotto 5 in TLC (gel di silice) migra con un  $R_f = 0.4$  quando eluito con  $\text{CHCl}_3$ / acetone/  $\text{CH}_3\text{OH}$ /  $\text{CH}_3\text{COOH}$ /  $\text{H}_2\text{O} = 50/ 15/ 5/ 5/ 2$  e sviluppato con il reattivo al rame solfato.

ESEMPIO 5 (Scambio ionico dell'anione da DOTAP Tosilato a DOTAP Cloruro – 6)

MP



50 g di DOTAP-OTs grezzo (ottenuto nell'esempio 4 – Titolo 66%; 39.6 mmol) si sciolgono in 150 ml di metanolo, questa soluzione si carica su una colonna cromatografica impaccata con 230 ml di resina a scambio ionico basica forte IRA 404 forma cloruro (prodotta dalla Rohm & Haas) precedentemente lavata con 1.2 L di acqua distillata e ambientata in metanolo (1.2 L). Quindi si eluisce per gravità la soluzione metanolica contenente il DOTAP-OTs con un flusso pari a 2.5 ml/minuto, scartando un volume morto di circa 50 ml. Si completa infine l'eluizione del prodotto con metanolo, raccogliendo un'unica frazione di circa 600 ml. Questa soluzione si concentra al rotavapor fino ad un volume di 100 ml, quindi si aggiungono 100 ml di acetonitrile e questa soluzione si porta fino a residuo oleoso (44.0 g) al rotavapor. Questo residuo si cristallizza da acetonitrile a – 20°C. Ottenuti dopo una notte di essiccamiento con alto vuoto a T amb. 20.7 g (29.7 mmol) di DOTAP-Cl resa 75%.

Il prodotto 6 in TLC (gel di silice) migra con un  $R_f = 0.4$  quando eluito con  $\text{CHCl}_3/\text{acetone}/\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_3\text{COOH}/\text{H}_2\text{O} = 50/15/5/5/2$  e sviluppato con il reattivo al ramesolfato.

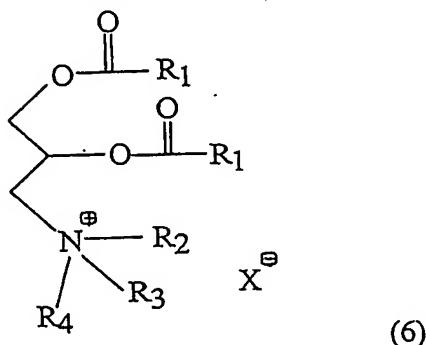
$^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.6 (m Broad, 1H,  $\text{OCHCH}_2$ ); 5.28 (m, 4H, 2 $\times$   $\text{CH}=\text{CH}$ ); 4.5 (t, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CHO}$ ); 4.05 (dd, 1H,  $H'\text{CHN}(\text{CH}_3)_3$ ); 3.7 (dd, 1H,  $\text{HCH}'\text{N}(\text{CH}_3)_3$ ); 3.47 (s, 9H,  $\text{N}(\text{CH}_3)_3$ ) 2.26 (m, 4H, 2 $\times$   $\text{CH}_2\text{COO}$ ); 1.9 (m, 8H, 4 $\times$   $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}$ ); 1.5 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}$ ); 1.4-1.2 (m, 36H,  $\text{CH}_2$  alifatici); 0.82 (dt, 6H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  173.1, 172.7, 130.0, 129.9, 129.6, 129.5, 65.9, 65.7, 63.2, (3) 54.2, 34.1, 33.9, 31.9, 29.7, 29.5, 29.3, 29.2, 29.17, 29.14, 29.09, 27.2, 27.1, 24.7, 24.6, 22.6, 14.1.

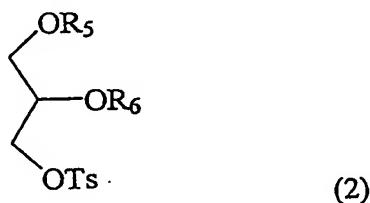
MP

## RIVENDICAZIONI

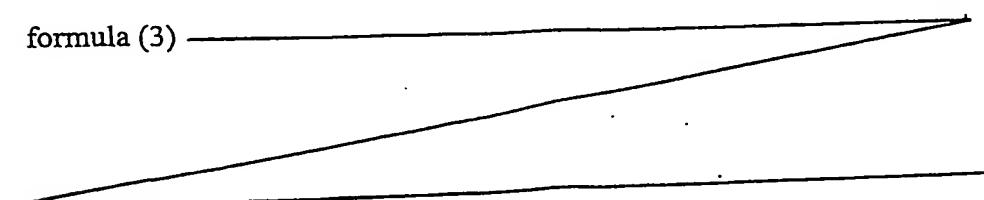
1. Un processo per la sintesi di cationi lipidici aventi formula generale (6):

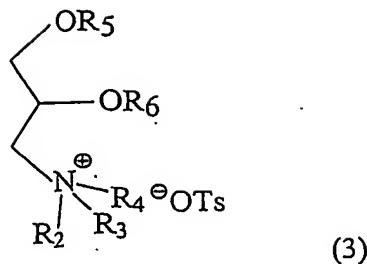


dove:  $R_1$  rappresenta una catena lipofilica preferibilmente selezionata tra radicali alchilici  $C_1-C_{24}$ , alchenilici  $C_1-C_{24}$ , alchinili  $C_1-C_{24}$ , alcanoilici  $C_1-C_{24}$ , alchenoilici o alchinoilici  $C_1-C_{24}$ ;  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  uguali o diversi tra loro rappresentano radicali alchilici  $C_1-C_{10}$ , alchenilici  $C_1-C_{10}$ , alchinili  $C_1-C_{10}$ , opzionalmente contenenti funzioni idrossiliche, etere, alogenici e acilossi;  $X^-$  è un ossianione o un alogenuro; caratterizzato dal fatto che un composto di formula (2),



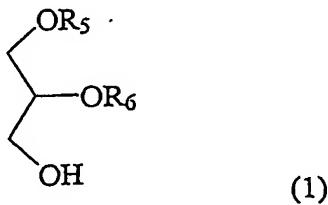
dove  $R_5$  e  $R_6$  uguali o diversi tra loro rappresentano un acile  $C_1-C_5$ , un gruppo benzile o un gruppo protettivo dei dioli, è fatto reagire in un solvente alcoolico con da 1 a 6 equivalenti di  $NR_2R_3R_4$ , dove  $R_2$ ,  $R_3$  ed  $R_4$  hanno i significati precedentemente riportati, a dare il composto di formula (3) ——————





dove  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_5$  e  $R_6$  hanno i significati precedentemente riportati.

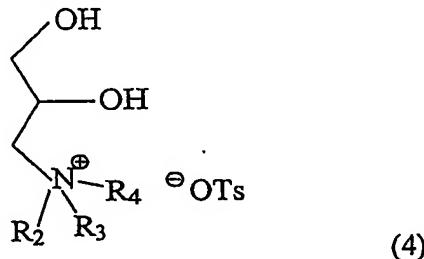
2. Un processo secondo la rivendicazione 1 caratterizzato dal fatto che detto solvente alcoolico è selezionato tra etanolo, isopropanolo e/o metanolo.
3. Un processo secondo la rivendicazione 1 caratterizzato dal fatto che detto solvente alcoolico è impiegato in quantità di 0.5÷1.5 litri per equivalenti di  $NR_2R_3R_4$ .
4. Un processo secondo la rivendicazione 1 caratterizzato dal fatto che  $R_2$ ,  $R_3$  ed  $R_4$  sono tutti e tre radicali metilici
5. Un processo secondo la rivendicazione 1 caratterizzato dal fatto di essere condotto ad una temperatura di 50÷100°C
6. Un processo secondo la rivendicazione 1 caratterizzato dal fatto che detto gruppo protettivo dei dioli è un chetale, preferibilmente un chetale ciclico, ancora più preferibilmente un solchetale.
7. Un processo secondo una qualsiasi delle precedenti rivendicazioni caratterizzato dal fatto che detto composto di formula (2) è ottenuto facendo reagire da 0.9 ad 1.2 equivalenti di composto di formula (1)



PP

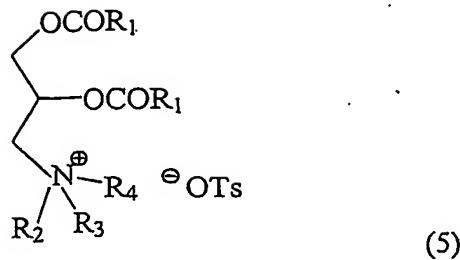
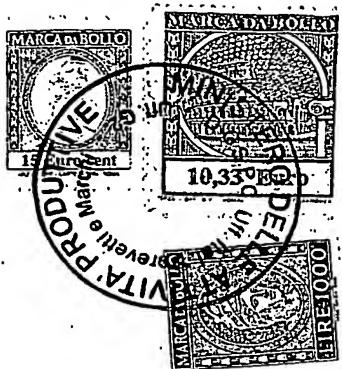
con 1 equivalente di tosil alogenuro, preferibilmente cloruro, in un solvente organico apolare.

8. Un processo secondo la rivendicazione 7 caratterizzato dal fatto che detto solvente organico apolare è un idrocarburo, preferibilmente toluene.
9. Un processo secondo la rivendicazione 7 caratterizzato dal fatto che detta reazione è condotta ad una temperatura di 15÷35° C, preferibilmente a 20÷25° C.
10. Un processo secondo la rivendicazione 7 caratterizzato dal fatto che detta reazione è condotta utilizzando da 0.8 a 1.2 litri di solvente per equivalente di composto (1).
11. Un processo secondo una qualsiasi delle precedenti rivendicazioni comprendente la rimozione dei gruppi R<sub>5</sub> e R<sub>6</sub> a dare il composto (4)



dove R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> ed R<sub>4</sub> hanno i significati precedentemente riportati; la successiva reazione del composto (4) con 2÷4 equivalenti di R<sub>1</sub>COCl in un solvente organico apolare aprotico, preferibilmente un solvente clorurato, dove R<sub>1</sub> ha il significato sopra riportato, a dare il composto (5) —————

MM



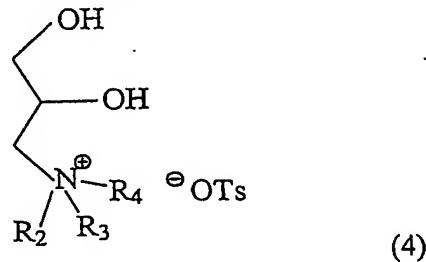
dove  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  ed  $R_4$  hanno i significati precedentemente riportati; il successivo scambio ionico dell'anione tosilato del composto (5) con un anione alogenuro a dare il catione lipidico di formula (6).

12. Un processo secondo la rivendicazione 11 caratterizzato dal fatto che i gruppi  $R_5$  e  $R_6$  sono rimossi per idrolisi acida.
13. Un processo secondo la rivendicazione 11 caratterizzato dal fatto che detto solvente organico apolare aprotico è utilizzato in quantità di  $3.5 \div 5.5$  litri per equivalente di composto (4).
14. Un processo secondo la rivendicazione 11 caratterizzato dal fatto che detto solvente organico apolare aprotico è selezionato tra cloruro di metilene, cloroformio o tetrachloruro di etile.
15. Un processo secondo la rivendicazione 11 caratterizzato dal fatto che detto scambio ionico viene effettuato per cromatografia su resina a scambio ionico.
16. Un processo secondo la rivendicazione 15 caratterizzato dal fatto che detta resina a scambio ionico è una resina basica forte.
17. Un processo secondo una qualsiasi delle precedenti rivendicazioni caratterizzato dal fatto che detto catione lipidico di formula (6) è purificato per cristallizzazione, preferibilmente da acetonitrile.
18. Un processo una qualsiasi delle precedenti rivendicazioni caratterizzato dal fatto che detto catione lipidico di formula (6) è l' $\text{N}-[1-(2,3-$

*Par*

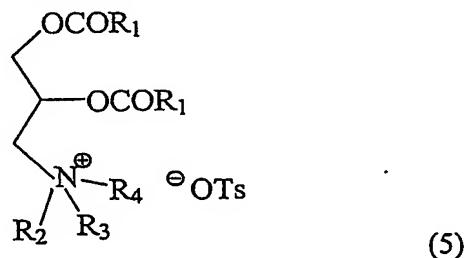
dioleilossi)propil]-N,N,N-trimetilammonio cloruro (DOTAP-Cl).

19. Un composto di formula (4)



dove  $R_2$ ,  $R_3$  ed  $R_4$  uguali o diversi tra loro rappresentano radicali alchilici  $C_1-C_{10}$ , alchenilici  $C_1-C_{10}$ , alchinilici  $C_1-C_{10}$ , opzionalmente contenenti funzioni idrossiliche, etero, alogenici e acilossi.

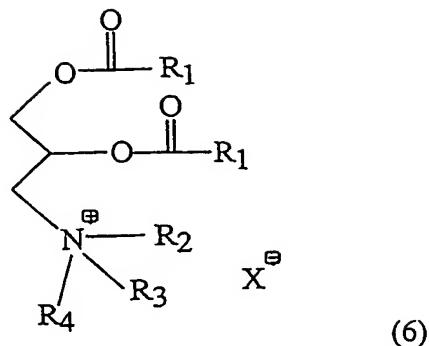
20. Un composto di formula (5)



dove:  $R_1$  rappresenta una catena lipofilica preferibilmente selezionata tra radicali alchilici  $C_1-C_{24}$ , alchenilici  $C_1-C_{24}$ , alchinili  $C_1-C_{24}$ , alcanoilici  $C_1-C_{24}$ , alchenoilici o alchinoilici  $C_1-C_{24}$ ;  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  uguali o diversi tra loro rappresentano radicali alchilici  $C_1-C_{10}$ , alchenilici  $C_1-C_{10}$ , alchinilici  $C_1-C_{10}$ , opzionalmente contenenti funzioni idrossiliche, etero, alogenici e acilossi.

21. Uso dei composti di formula (4) e/o (5) quali intermedi nella sintesi di cationi lipidici aventi formula generale (6):

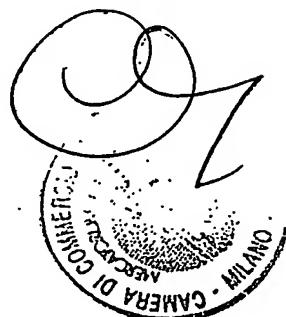
\_\_\_\_\_



dove:  $\text{R}_1$  rappresenta una catena lipofilica preferibilmente selezionata tra radicali alchilici  $\text{C}_1\text{-C}_{24}$ , alchenilici  $\text{C}_1\text{-C}_{24}$ , alchinili  $\text{C}_1\text{-C}_{24}$ , alcanoilici  $\text{C}_1\text{-C}_{24}$ , alchenoilici o alchinoilici  $\text{C}_1\text{-C}_{24}$ ;  $\text{R}_2$ ,  $\text{R}_3$ ,  $\text{R}_4$  uguali o diversi tra loro rappresentano radicali alchilici  $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ , alchenilici  $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ , alchinili  $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ , opzionalmente contenenti funzioni idrossiliche, etere, alogeni e acilossi;  $\text{X}^{\ominus}$  è un ossianione o un alogenuro.

Il Mandatario

Dr. Roberto Pistolesi  
 della Dragotti & Associati Srl  
 (Iscr. Albo No. 853)



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record.**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER: \_\_\_\_\_**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**